



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 56 136 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 38/17**

⑳ Aktenzeichen: 100 56 136.5  
㉑ Anmeldetag: 7. 11. 2000  
㉒ Offenlegungstag: 16. 5. 2002

DE 100 56 136 A 1

㉓ Anmelder:  
Nemod New Modalities, 13125 Berlin, DE  
  
㉔ Vertreter:  
Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig &  
Schneider, 10117 Berlin

㉕ Erfinder:  
Stahn, Renate, 13125 Berlin, DE; Goletz, Steffen,  
13129 Berlin, DE; Jeschke, Udo, 18057 Rostock, DE;  
Fichtner, Iduna, 13125 Berlin, DE; Zeisig, Reinhard,  
10435 Berlin, DE

㉖ Entgegenhaltungen:  
US 58 54 218 A  
US 57 60 000 A  
US 55 99 915 A  
US 49 77 244  
US 42 84 623  
WO 90 02 759 A1  
WO 01 11 048 A2  
WO 00 50 071 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉗ Verwendung von Schwangerschaftsproteinen, Liposomen, nativen Muzin-Fragmenten und Mimikry-Verbindungen zur Behandlung und Prophylaxe von entzündlichen Erkrankungen, zur Verhinderung der Metastasierung und zur Prophylaxe von Tumorerkrankungen

㉘ Die Erfindung betrifft die Verwendung von Schwangerschaftsproteinen oder deren Fragmente, von Liposomen, die an Selektin binden und Ca-bindende Verbindungen enthalten, von Muzin-Fragmenten, die aus natürlichen Quellen stammen oder von Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ (sLe) imitieren, oder deren Kombinationen zur Behandlung und Prophylaxe von Erkrankungen, in deren Verlauf entzündliche Prozesse eine Rolle spielen, wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Arteriosklerose. Entzündungserkrankungen im Sinne der Erfindung können infektiöser oder nicht infektiöser Natur sein.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur teilweisen oder vollständigen Verhinderung der Metastasierung von Tumoren, wobei die Gabe der Wirkstoffe prophylaktisch oder im Zusammenhang mit beispielsweise einer operativen Entfernung des Primärtumors oder einer Biopsie erfolgen kann. Gegenstand ist daneben auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur Prophylaxe von Tumorerkrankungen.

DE 100 56 136 A 1

- [0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Schwangerschaftsproteinen oder deren Fragmenten, von Liposomen, die an Selektin binden und Ca-bindende Verbindungen enthalten, von Muzin-Fragmenten, die aus natürlichen Quellen stammen oder von Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ (sLe) imitieren, oder deren Kombinationen, zur Behandlung und Prophylaxe von Erkrankungen, in deren Verlauf entzündliche Prozesse eine Rolle spielen, wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Arteriosklerose. Entzündungserkrankungen im Sinne der Erfindung können infektiöser oder nichtinfektiöser Natur sein.
- [0002] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur teilweisen oder vollständigen Verhinderung der Metastasierung von Tumoren, wobei die Gabe der Wirkstoffe prophylaktisch oder im Zusammenhang mit beispielsweise einer operativen Entfernung des Primärtumors oder einer Biopsie erfolgen kann. Gegenstand ist daneben auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur Prophylaxe von Tumorerkrankungen.
- [0003] Die Verwendung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe bezieht sich sowohl auf die Humanmedizin als auch auf die Veterinärmedizin.
- [0004] Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Mittel gemäß der Ansprüche 10–18, die diese Wirkstoffe beinhalten.
- [0005] Aus der Literatur ist bekannt, dass Peptide und Liposomen mit sialylierten Lewis x- oder sialylierten Lewis a-Kohlenhydrat-Liganden (sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup>) die Adhäsion von Leukozyten oder Tumorzellen an E- oder P-Selektine (Oberflächenproteine, die von aktivierten vascularen Endothelzellen exprimiert werden) hemmen [vgl. z. B. Sh. A. DeFrees et al., J. Am. Chem. Soc. 118 (1996), 6101–6104; R. Stahn et al., Glycobiology Vol. 8, No. 4 (1998), 311–319]. Lewis-Kohlenhydrat-Strukturen binden an die Lektindomäne dieser Selektine und hemmen damit die Zelladhäsion aus dem Blutstrom. Es ist weiterhin bekannt, dass eine bessere Blockade der Selektine z. B. mit di- und trivalenten sLe<sup>x</sup>-Peptiden [(sLe<sup>x</sup>)<sub>2</sub>-Peptiden und (sLe<sup>x</sup>)<sub>3</sub>-Peptiden] und mit sLe<sup>x</sup>-Liposomen, die mehrere Lewis-Kohlenhydratreste als Bestandteil der Membran aufweisen, erreicht werden kann. Die Multivalenz dieser Kohlenhydrat-Selektin-Bindungen bewirkt eine verbesserte Hemmung der Adhäsion von Zellen an das/die Selektin(e).
- [0006] In der Literatur wird auch beschrieben, dass sLe<sup>a</sup> oder sLe<sup>x</sup>-tragende Muzine an E-Selektin binden und die Leukozytenadhäsion oder die Adhäsion von Tumorzellen an E-Selektin hemmen [K. Zang et al., Tumor Biology 18 (1997), 175–187]; T. Sawada et al., Int. J. Cancer 57 (1994), 901–907]. Bei den Muzinen handelt es sich um hochmolekulare Glykoproteine.
- [0007] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, alternative Verbindungen aufzufinden, die die Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktiviertes Endothelzellgewebe der Blutgefäße hemmen oder Verbindungen aufzufinden, die eine effektivere Hemmwirkung zeigen, indem sie spezifischer und/oder mit höherer Affinität an aktiviertes Endothelzellgewebe binden als die im Stand der Technik bisher beschriebenen Inhibitoren. Die Verbindungen sollen als Wirkstoffe zur Prophylaxe und Therapie entzündlicher Erkrankungen und von Tumorerkrankungen geeignet sein.
- [0008] Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass humane oder tierische Schwangerschaftsproteine äußerst effiziente Inhibitoren der Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktiviertes Gefäßendothel sind. Diese Funktion ist neu. Sie binden spezifisch und hochaffin an Selektine.
- [0009] Im Sinne der Erfindung werden als Schwangerschaftsproteine solche eingesetzt, die während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildet werden. Solche Proteine sind insbesondere die humanen Schwangerschaftsproteine, vorzugsweise gonadotrope Hormone, wie z. B. FSH (Folikel stimulierendes Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon) hCG (humanes Choriogonadotropin), oder  $\alpha$ -Fetoprotein, Transferrin, Glycodeline, insbesondere Glycodelin A (PP 14), Immunoglobulin G oder deren Fragmente. Gemäß der Erfindung können die aus humanem oder tierischem Fruchtwasser, Serum oder Urin isolierten Proteine eingesetzt werden sowie synthetisch hergestellte Proteine, die die gleichen Eigenschaften wie die während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildeten nativen Proteine haben. Die Proteine können auch aus schwangerschaftsassozierten Zellkulturen, die sich von der Plazenta ableiten, wie beispielsweise Trophoblastenkulturen, die nicht verändert wurden oder die durch Anreicherung, Stimulation mit Hilfe geeigneter Moleküle und/oder Transfektion geeigneter Gene, die die gewünschten Schwangerschaftsproteine oder Teile dieser, einschließlich der geeigneten Glykosylierungen, exprimieren, gewonnen werden. Beispielsweise hCG, das aus Trophoblasten-Zellkulturen/Zelllinien isoliert wird, ist für den erfindungsgemäßen Einsatz geeignet.
- [0010] Die erfindungsgemäß eingesetzten Schwangerschaftsproteine können auch an geeignete biologische oder chemische Trägermoleküle oder Partikel, wie beispielsweise Proteine, Bakteriophagen oder Liposomen, vorzugsweise Ca-komplexierende Verbindungen enthaltende Liposomen, gekoppelt sein.
- [0011] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Liposomen, die an Selektin binden und Ca-bindende Verbindungen, insbesondere EDTA, enthalten und die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ in Form von Glycolipiden, Glycoproteinen oder Glycopeptiden als Bestandteil der Liposomenmembran tragen, zur effizienten Hemmung der Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktiviertes Endothelzellgewebe der Blutgefäße eingesetzt. Die erfindungsgemäßen eingesetzten Liposomen liegen bevorzugt als ein- oder mehrschichtige Vesikel vor und bestehen aus einem Basislipid, vorzugsweise Phosphatidylcholin, und dem Ankerlipid, vorzugsweise Phosphatidylethanolamin, und enthalten als zusätzliche Wirkkomponente eine Ca-bindende oder Ca-komplexierende Verbindung, z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). An das Ankerlipid ist der Kohlenhydratlignand beispielsweise über einen Spacer, der eine Polyethylenglykolkette, ein Peptid oder eine Alkylgruppe sein kann, gebunden. Vorzugsweise findet hierfür sLe<sup>x</sup>-polyethylenglykoll<sub>2000</sub>-diärylphosphoethanolamin Verwendung. Als zusätzliche Membrankomponenten kommen Ladungsträger wie Diäcetylphosphat und Membranstabilisatoren wie Cholesterol in Betracht.
- [0012] Die Herstellung derartiger Glycoliposomen ist dem Fachmann bekannt.
- [0013] Erfindungsgemäß können auch Liposomen, die Ca-bindende Verbindungen enthalten und Antikörper, Antikörper-Fragmente, Peptide, Glycopeptide oder andere Proteine oder Glycoproteine tragen, welche an Selektin binden, eingesetzt werden. Ebenso können Liposomen, die Ca-bindende Verbindungen enthalten und Mimikry-Verbindungen tragen, die die sLe-Strukturen imitieren, verwendet werden.

[0014] Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen Liposomen eine beträchtlich höhere Hemmwirkung als die in der Literatur beschriebenen "leeren" Glycoliposomen. So zeigen beispielsweise EDTA-Glycoliposomen gemäß Beispiel 4 eine um ein vielfaches gesteigerte Hemmwirkung der Tumorzellbindung im Vergleich zu Glykoliposomen der gleichen Zusammensetzung, jedoch ohne eingeschlossene EDTA.

[0015] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden niedermolekulare Fragmente von Muzinen aus natürlichen Quellen, z. B. körpereigenen Flüssigkeiten oder Zellkulturen, zur Hemmung der Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktivierte Endothelzellen eingesetzt.

[0016] Da es sich bei den Muzinen um hochmolekulare Glykoproteine handelt, die immunologische Reaktionen auslösen können, ist ihre Verwendung als Adhäsionsblocker in der Klinik problematisch. Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen niedermolekularen Fragmente, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ aufweisen, und aus natürlichen Muzinen hergestellt werden, können diese Probleme vermieden werden. Die niedermolekularen Fragmente zeigen überraschenderweise eine bessere Hemmung als die in der Literatur beschriebenen Muzine.

[0017] Die erfindungsgemäßen Muzinfragmente werden beispielsweise durch enzymatischen Abbau hergestellt.

[0018] Erfindungsgemäß können die Muzine auch an geeignete biologische oder chemische Trägermoleküle oder Partikel, wie beispielsweise Proteine, Bakteriophagen oder Liposomen, vorzugsweise Ca-komplexierende Verbindungen enthaltende Liposomen, gekoppelt sein.

[0019] Die Aufgabe der Erfindung wird in einer weiteren Ausführungsform durch die Verwendung von Verbindungen gelöst, die die Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren (sogenannte Mimikry-Verbindungen), und mit hoher Spezifität und Affinität an Selektine binden und mit Hilfe von Molekülen gewonnen werden, die die Kohlenhydratstruktur vom Lewis Typ erkennen. Solche Verbindungen können beispielsweise lineare oder zirkuläre Peptide, Antikörper oder Antikörperfragmente oder andere Proteinstrukturen wie beispielsweise Protein-Scaffolds mit variablen Anteilen, die ähnlich wie Antikörperfragmente wirken, sein.

[0020] Mimikry-Verbindungen in Form von Mimikry-Peptiden, Antikörpern, Antikörperfragmenten, Proteinen mit variablen Anteilen werden hergestellt, indem man:

a. mit der Hybridomtechnik mit Hilfe von Substanzen, die Kohlenhydrate vom Lewis Typ spezifisch erkennen (z. B. Antikörper oder Lektine, die keine Selektine sind), monoklonale Antikörper, die die kohlenhydrat-bindenden Regionen dieser Substanzen binden und somit die Kohlenhydrate vom Lewis-Typ imitieren, herstellt bzw. selektioniert,

b. aus genomischen, Hybrid-, semisynthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken sowie aus Genbibliotheken immunisierter oder nicht-immunisierter Spender beispielsweise mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen, die Kohlenhydrate vom Lewis Typ spezifisch erkennen (z. B. Antikörper oder Lektine, die keine Selektine sind), rekombinante Antikörperfragmente wie beispielsweise single-chain Antikörperfragmente (scFv) oder Fab Fragmente, die die kohlenhydratbindende Regionen dieser Substanzen binden und somit die Kohlenhydrate vom Lewis-Typ imitieren, herstellt bzw. selektioniert,

c. aus synthetischen Peptid-Genbibliotheken beispielsweise mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen, die Kohlenhydrate vom Lewis Typ spezifisch erkennen (z. B. Antikörper oder Lektine), lineare oder zirkuläre Peptide, die die kohlenhydrat-bindende Regionen dieser Substanzen binden und somit die Kohlenhydrate vom Lewis-Typ imitieren, herstellt bzw. selektioniert,

d. aus Protein-Genbibliotheken, die Proteine mit synthetischen oder semisynthetischen variablen Anteilen darstellen, beispielsweise mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen, die Kohlenhydrate vom Lewis Typ spezifisch erkennen (z. B. Antikörper oder Lektine, die keine Selektine sind), Proteine, die die kohlenhydrat-bindende Regionen dieser Substanzen binden und somit die Kohlenhydrate vom Lewis-Typ imitieren, herstellt bzw. selektioniert,

[0021] und eine den Antikörpern, Proteinen oder Peptiden nach a-d oder geeigneten Teilpeptiden oder abgeleiteten Peptiden, beispielsweise durch Zirkularisierung, Mutationen, in Form inverser oder retroinverser Peptide, oder repetitiven Konstrukten nach an sich bekannten Verfahren erzeugt.

[0022] Erfindungsgemäß bevorzugt werden Mimikry-Verbindungen mit Hilfe eines  $sLe^x$ - oder eines  $sLe^a$ -spezifischen Antikörpers hergestellt, der das Kohlenhydrat  $sLe^x$  oder  $sLe^a$  als Mimikry-Molekül imitiert.

[0023] Die erfindungsgemäßen Mimikry-Verbindungen sind bisher weder als Substanzen an sich, noch für den erfindungsgemäßen Einsatz beschrieben. Sie verhindern effektiv die Bindung von Tumorzellen und Leukozyten an die Selektine und können somit zur Prophylaxe oder Therapie von entzündlichen Erkrankungen und Tumorerkrankungen eingesetzt werden. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Mimikry-Verbindungen zum erfindungsgemäßen Einsatz an Liposomen gekoppelt, vorzugsweise an Liposomen, die Ca-komplexierende Verbindungen, wie beispielsweise EDTA, enthalten.

[0024] Wie bereits dargestellt, können die Mimikry-Verbindungen lineare oder zirkuläre Peptide sein, wobei die letzteren häufig eine höhere Serumstabilität aufweisen, oder alternativ die relativ stabilen inversen oder retroinversen Peptide. Auch Antikörper oder Antikörper-Fragmente, beispielsweise single-chain (scFv) oder Fab Antikörper-Fragmente werden erfindungsgemäß eingesetzt, wobei humane Antikörperfragmente den großen Vorteil haben, dass sie in der Regel keine Immunantwort gegen Maus- oder andere Fremdkörper induzieren, welche die Antikörper bindet und damit nach kurzer Zeit die Antikörper neutralisieren kann, weshalb die humanen Antikörperfragmente auch wiederholt eingesetzt werden können. Eine Tatsache, die für die Hemmung von Entzündungsreaktionen und die Verhinderung oder Verminderung von Metastasierungen von Vorteil ist. Auch andere Proteine finden Verwendung, bevorzugt mit einem Grundgerüst (Scaffold) eines humanen Proteins in Kombination mit variablen Abschnitten (z. B. Affibodies), die im wesentlichen für das molekulare Mimikry verantwortlich sind.

[0025] Eine Möglichkeit, diese Moleküle zu gewinnen, ist dabei eine Selektion der Moleküle mit Hilfe der Phagen-Display Technologie, indem man einen Antikörper gegen das  $sLe^x$  oder  $sLe^a$  als Antigen verwendet und die Moleküle,

die die kohlenhydratspezifische Bindungsstelle des Antikörpers binden, aus den entsprechenden Bibliotheken isoliert:

– Neben der Phagen-Display Technologie sind auch Ribosomen-Display oder vergleichbare Technologien geeignet die Mimikry Moleküle zu gewinnen. Mimikry Moleküle auf Proteinbasis können auch mit Hilfe des molekularen Modellings konstruiert und durch molekular biologische Methoden rekombinant hergestellt werden. Mimikry Moleküle die nicht auf Proteinen basieren können auch durch kombinatorische Chemie und/oder molekulares Modell-  
ing gewonnen werden.

– Bei den Bibliotheken handelt es sich beispielsweise um: Peptid-Bibliotheken, die lineare oder zirkuläre Peptide darstellen; um Antikörper-Bibliotheken, die Antikörper-Fragmente darstellen und synthetisch, semisynthetisch oder aus humanem Material gesunder Spender oder Patienten hergestellt werden; Bibliotheken, die ein Scaffoldprotein mit randomisierten variablen Regionen darstellen, wie beispielsweise den Affibodies.

– Neben sLe<sup>x</sup>-spezifischen Mausantikörpern können für die Gewinnung von Mimikry-Strukturen auch Lektine, andere Antikörper oder Antikörperfragmente humanen oder tierischen Ursprungs, die sLe<sup>x</sup>, sLe<sup>a</sup> oder andere Kohlenhydrate vom Lewis Typ erkennen, die für die Adhäsion der Tumorzellen oder Leukozyten an das aktivierte Endothel im Sinne des Patentes verantwortlich sind, verwendet werden.

– Die Gewinnung in den Selektionen kann dabei mit Hilfe einer spezifischen Elution durch einen großen Überschuss der entsprechenden Kohlenhydrate erfolgen, mit dem Vorteil die Versuchszeiten zu verkürzen. Zur Isolierung der Mimikry-Moleküle mit der höchsten Affinität ist es jedoch vorteilhaft keine spezifische Elution einzubauen.

**[0026]** Die Selektionen von Mimikry-Peptiden und humanen scFv-Antikörperfragmenten, die das sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> imitieren, sind in den Beispielen näher aufgeführt.

**[0027]** Die Mimikry-Moleküle haben mehrere Vorteile:

– die Herstellung von Kohlenhydraten ist sehr teuer und aufwendig; Mimikry-Peptide, denen eine Kohlenhydratmodifikation fehlt, können dagegen schneller und günstiger synthetisch oder biologisch, beispielsweise durch molekular biologische Methoden an Bakteriophagen gekoppelt, hergestellt werden; Antikörperfragmente und andere Proteine können schneller und günstiger rekombinant in Bakterien oder tierischen Zellen hergestellt werden.

– Mimikry-Moleküle können eine höhere Affinität gegenüber den Selektinen aufweisen. Damit ist das Inhibitionspotential höher.

**[0028]** Um die Affinität weiter zu erhöhen, werden multimeren Mimikry-Entitäten in Form von Molekülen oder Partikeln geschaffen: beispielsweise durch multiple Kopplung der Mimikry-Moleküle an Trägerproteine, wie beispielsweise HSA; multiple Expression der Mimikry-Moleküle als Fusionsproteine mit Bakterienhüllproteinen auf Bakteriophagen; durch Kopplung der Mimikry-Moleküle an Lipide und Einbau in Liposomen.

**[0029]** Diese Moleküle oder Partikel mit multiplen Mimikry-Molekülen sind den ursprünglichen monomeren Kohlenhydraten vom Lewis-Typ in der gewünschten Inhibition der Zelladhäsionen in in vitro Tests analog zu den oben beschriebenen um Größenordnungen überlegen.

**[0030]** Erfindungsgemäß können die Mimikry-Verbindungen auch an geeignete biologische oder chemische Trägermoleküle oder Partikel, wie beispielsweise Proteine, Bakteriophagen oder Liposomen, vorzugsweise Ca-komplexierende Verbindungen enthaltende Liposomen, gekoppelt sein.

**[0031]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden vorteilhafterweise zur Inhibition der Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktiviertes Gefäßendothel Selektinspezifische Antikörper oder Antikörperfragmente eingesetzt, die an Liposomen gekoppelt sind, vorzugsweise an Liposomen, die Ca-komplexierende Verbindungen, wie beispielsweise EDTA, enthalten. Solche Antikörper sind bekannt. Als Antikörper kann z. B. der monoklonale, kommerziell angebotene Antikörper BBA2 der Firma R & D Systems eingesetzt werden. Es stellt für den Fachmann auch kein Problem dar, Selektinspezifische Antikörper, herzustellen.

**[0032]** Analog kann die Inhibition der Zelladhäsion auch durch Peptide oder andere Proteine erreicht werden, die an Liposomen gekoppelt sind und gleichzeitig Ca-komplexierende Verbindungen enthalten.

**[0033]** Die Vorteile dieser Ausführungsform sind:

– eine Multimerisierung der Bindungen und dadurch eine Erhöhung der Affinität durch den Aviditätseffekt, der dazu führt, dass die Inhibition der die Lewis Typ Kohlenhydrate exprimierenden Tumorzellen oder Leukozyten an die aktivierten Endothelzellen um ein vielfaches verstärkt wird im Vergleich zu einzelnen Antikörpern

– es können direkt humane scFv oder Fab, die durch die oben beschriebenen Selektionstechniken aus den Antikörper-Bibliotheken isoliert wurden und im Prinzip monomere Antikörperfragmente sind, eingesetzt werden. Der Vorteil hierbei ist die verringerte Immunreaktion gegen humane Antikörperfragmente,

– eine Integration in die Liposomenmembran. Durch eine laterale Beweglichkeit der bindungsfähigen Liganden in der Membran wird eine Anpassung an die Anordnung von Selektinen zur effektiven Bindung möglich. Dagegen können bei Ankopplung der Liganden an ein starres Gerüst (z. B. rigide Proteinstruktur) sterische Hinderungen auftreten, die eine Reduktion der Inhibitionseffektivität bewirken können,

**[0034]** Die vorstehend beschriebenen Verbindungen sind aufgrund ihrer beschriebenen Zelladhäsionshemmung als Wirkstoffe zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, in deren Verlauf entzündliche Prozesse eine Rolle spielen, sehr gut geeignet. Dabei können die Verbindungen einzeln oder in beliebigen Kombinationen miteinander eingesetzt werden. Es ist selbstverständlich auch möglich, durch geeignete Formulierungen, beispielsweise durch Zusatz immunstimulatorischer oder immuninhibitorischer Verbindungen, wie Lymphokinen, Zytokinen, Chemokinen oder Adjuvantien, die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen noch zu verbessern.

**[0035]** Die Herstellung der auf diesen Wirkstoffen basierenden pharmazeutischen Mittel erfolgt nach üblichen, in der

galenischen Technik bekannten Verfahren mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen.

[0036] Insbesondere finden die erfindungsgemäßen Verbindungen Anwendung zur

- a) Prophylaxe zur Verhinderung oder Minderung der Metastasierung in Risikosituationen wie beispielsweise bei Operationen von Tumoren oder Biopsien bei Tumorverdacht. 5
- b) Prophylaxe zur Verhinderung oder Minderung der Metastasierung im Falle eines Verdachtes auf Tumorerkrankung.
- c) Prophylaxe zur Verhinderung oder Minderung der Metastasierung im Falle einer Tumorerkrankung.
- d) Prophylaxe zur Verhinderung oder Minderung der Metastasierung im Falle eines operativen Eingriffs im Zusammenhang mit der Minimalen Residualen Tumorerkrankung. 10
- e) Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- f) Verminderung von Gewebeschädigungen im Zusammenhang mit Operationen, Transplantationen, Ischämie und Reperfusion
- g) Behandlung von Erkrankungen im Frühstadium von Schwangerschaften
- h) Verminderung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen, wie z. B. Restenosen. 15

[0037] Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert, ohne sie auf diese Beispiele einzuschränken:

#### Beispiel 1

[0038] Isolierung von Amnion- hCG und Testung der Fähigkeit zur Hemmung der Zelladhäsion am Beispiel der Inhibition der Bindung von HepG2-Hepatom-Zellen an E-Selektin und an aktivierten Endothelzellen aus der Vene humaner Nabelschnüre (HUV1C). 20

#### Beispiel 1a

##### Isolierung von hCG aus dem Fruchtwasser

[0039] HCG wird vom Synzytiotrophoblasten nach der Implantation der befruchteten Eizelle gebildet und in den Blutkreislauf und das Fruchtwasser der Schwangeren sezerniert. Fruchtwasserproben aus der Chromosomenanalyse (500 ml) werden gegen PBS dialysiert. 1 mg Kaninchen mAK (Kaninchen anti human choriongonadotropin, DAKO), gerichtet gegen die  $\beta$ -Untereinheit des hCG wird an die entsprechende Menge CNBr-Sephrose gebunden. Mit der erhaltenen anti hCG-Sephrose wird eine Chromatographiesäule gefüllt, die zur Immunadsorption von hCG dient. Mittels 100 mM Citratpuffer wird das hCG isoliert und weiter mittels FPLC durch Anionenaustauschchromatographie an Resource Q aufgereinigt. HCG besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit, neben dem intakten hCG werden vom Trophoblasten auch freie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten gebildet. Die freie  $\beta$ -Kette macht etwa 2–3% des intakten hCG aus und erreicht wie dieses ein Maximum in der 10. Schwangerschaftswoche. Die freie  $\alpha$ -Kette nimmt demgegenüber während der Schwangerschaft kontinuierlich zu und erreicht im 3. Trimenon das Maximum. Mit der Immunadsorptionssäule gerichtet gegen die  $\beta$ -Kette des hCG werden so das Gesamtmolekül und freie  $\beta$ -Ketten isoliert. Freie  $\alpha$ -Ketten werden mit einer zweiten Antikörpersäule, beladen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen  $\alpha$ -Kette des hCGs gerichtet sind, isoliert. Mit Hilfe der Gelfiltration an Superdex 75 werden die freien  $\beta$ -Ketten vom intakten Gesamtmolekül abgetrennt und isoliert. Die Reinheit der Präparation wird durch SDS-PAGE und Silberfärbung geprüft. 30 35 40

#### Beispiel 1b

##### Durchführung des Adhäsionshemmtests

[0040] Nachfolgend beschriebener Adhäsionstest wird in vitro zur Testung der Wirkstoffe verwendet. Dazu wird entweder rekombinantes E-Selektin an 96 well-Titerplatten immobilisiert, oder die Expression von E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen aus der Vene humaner Nabelschnüre (HUVEC) durch Stimulation mit Cytokinen induziert. HUVEC Endothelzellen werden ebenfalls in 96 well-Mikrotiterplatten kultiviert. 50

[0041] E-Selektin (R & D Systems) (5  $\mu$ g/ml) wird durch Inkubation über Nacht bei 4°C immobilisiert. Die Platten werden mit einem Calcium-haltigen Phosphatpuffer (Ca-PBS) gewaschen und mit 1%igem Rinderserumalbumin (RSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Amnion-hCG (0,005–1 nMol/well) wird zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dann werden  $1 \times 10^5$   $^{51}$ Cr-markierte HepG2-Hepatom-Zellen, die an E-Selektin adhären, zugegeben und es wird für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die ungebundenen Zellen durch 3maliges Waschen mit Ca-PBS entfernt und die gebundenen Zellen nach Lyse mit 0,1 N Natronlauge durch Radioaktivitätsmessung quantifiziert. Als Kontrollen werden die kohlenhydratbindende Domäne von E-Selektin blockierende monoklonale Antikörper BBA2 (R&D Systems), EDTA zur Entfernung von Ca aus dem Testsystem und das selektiv, aber wenig affin bindende monovalente Tetrasaccharid Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) verwendet und in den Versuchsserien parallel mitgeführt. 55 60

[0042] HUVEC werden aus der Vene frischer humaner Nabelschnüre isoliert, bis zur 3. Passage verwendet und in 96 well Titerplatten zur Testung bis zur Konfluenz kultiviert. Durch Zugabe von 0,2 ng IL-1 $\beta$  pro well wird die Expression auf HUVEC induziert. Sie erreicht nach 4 Stunden ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt wird ein Adhäsionstest/Adhäsionshemmtest analog dem für immobilisiertem E-Selektin beschriebenen durchgeführt. 65

[0043] Tabelle 1 zeigt die Wirksamkeit von Amnion-hCG in beiden Testsystemen. Es sind die IC 50-Werte (Hemmstoffkonzentration für 50%ige Adhäsionshemmung) angegeben.

Tabelle 1

Hemmstoff	Immobilisiertes E-selektin IC 50 [M]	Aktivierte HUVEC IC 50 [M]
SLex	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$
mAk BBA2	$2 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-9}$
Amnion-hCG	$7,8 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-7}$

[0044] Es wird deutlich, dass hCG mindestens  $10^4$ fach wirksamer ist als sLe<sup>x</sup>.

## Beispiel 2

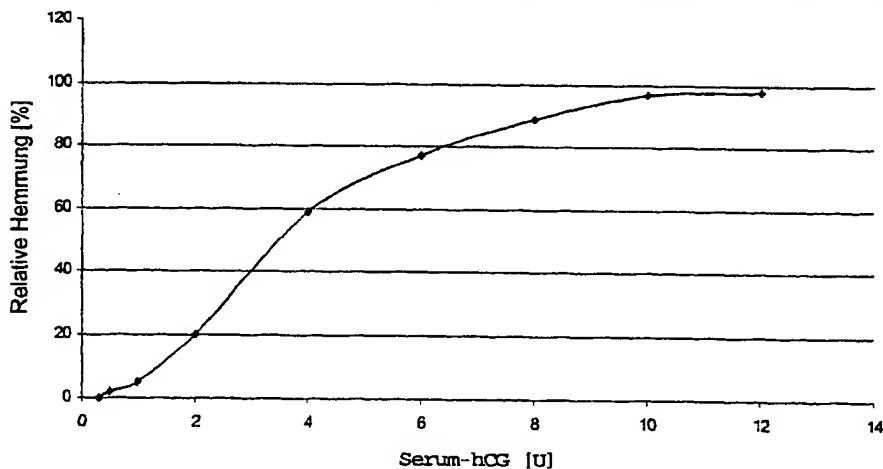
Isolierung von hCG aus dem Serum und Testung analog Beispiel 1b

[0045] HCG wird während der Schwangerschaft kontinuierlich in das Serum sezerniert. Im ersten Trimenon wird das Maximum erreicht. 500 ml Serumpool von Schwangeren aus dem 1. Trimester werden 2x gegen H<sub>2</sub>O und anschließend gegen 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dialysiert. Die Isolierung des Serum hCG's erfolgt analog zur Isolierung des Amnion hCG's.

[0046] Im Adhäsionshemmtest analog Beispiel 1b wird eine etwa 3fach niedrigere Wirkung im Vergleich zum Amnion-hCG gemessen jedoch eine  $10^4$ fache Steigerung gegenüber dem monovalenten Tetrasaccharid sLe<sup>x</sup>. Abb. 1 zeigt die Inhibition der HepG2-Zelladhäsion an immobilisiertem E-Selektin in Abhängigkeit von der Serum-hCG Konzentration.

Abb. 1

Hemmung der HepG2-Zelladhäsion durch Serum-hCG



## Beispiel 3

Isolierung von Glycodelin A (Amnion- PP14) und Testung analog Beispiel 1b

[0047] Die Vorreinigung von Glycodelin A aus Amnionflüssigkeit vollzieht sich im wesentlichen nach einer Vorschrift, bei der die gepoolten Fruchtwasserproben gegen Wasser und anschließend 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> dialysiert werden. Dieses Produkt wird an einer DEAE-Sepharose-Säule chromatographisch aufgetrennt. Die Glycodelin A-haltige Fraktion wird an einer Superdex 75-Säule und anschließend an einer Oktyl-Sepharose-Säule weiter gereinigt. Nach dem hydrophoben Interaktionschromatographieschritt an Oktyl-Sepharose wurde Glycodelin A an einer Resource-Phe Säule mit einem Isopropanol/Phosphatpuffergemisch als Lösemittel gereinigt.

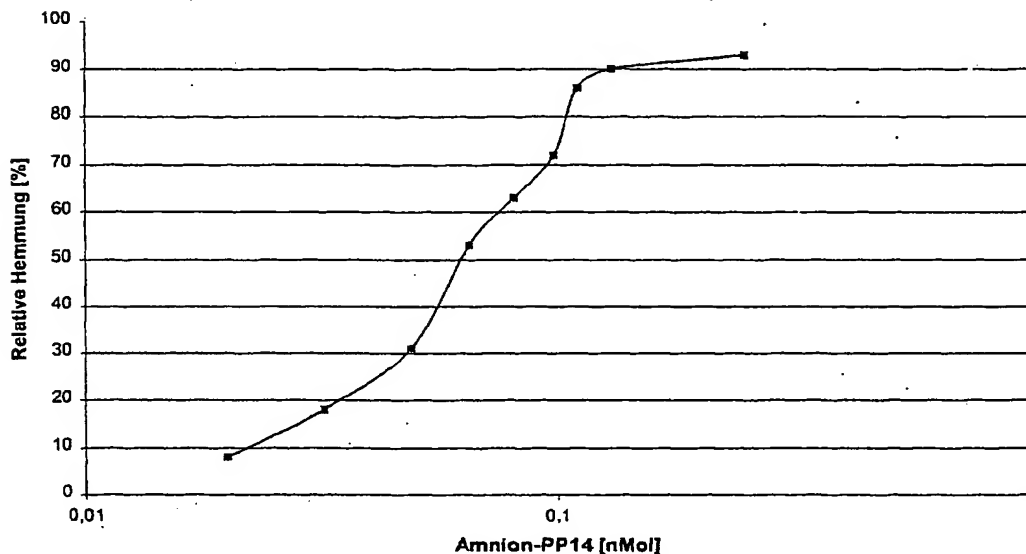
[0048] Alternativ kann Glycodelin A mit Hilfe der Immunadsorptionschromatographie gereinigt werden. Dazu werden 1 mg mAK (Maus anti human glycodelin, DNA Diagnostik Nord GmbH) an CNBr-Sepharose gebunden. Das Material

wird in eine 5 ml Chromatographiesäule gefüllt. Die so hergestellte Immunadsorptionssäule wird mit 500 ml gegen 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0) dialysiertes Fruchtwasser beladen. Glycodelin A wird mit 100 mM Citratpuffer eluiert. Die Reinheit der Präparation wird durch SDS-PAGE und Silberfärbung geprüft.

[0049] Im Adhäsionshemmtest analog Beispiel 1b wird eine etwa 10 fache niedrigere Wirkung im Vergleich zum Amnion-hCG gemessen jedoch eine  $10^3$  fache Steigerung gegenüber dem monovalenten Tetrasaccharid sLe<sup>x</sup>. Abb. 2 zeigt die Inhibition der HepG2-Zelladhäsion an aktivierte HUXTEC in Abhängigkeit von der Glycodelin A-Konzentration

Abb. 2

Hemmung der HepG2 Zelladhäsion an aktivierte HUVEC durch Amnion-PP14



## Beispiel 4

Herstellung und Testung von Glykoliposomen, die EDTA enthalten

## Beispiel 4a

[0050] Phosphatidylcholin, (PC; 7,44 mg), Sialy-Lewis<sup>x</sup>-polyethylenglykoll<sub>2000</sub>-distearylphosphoethanolamin (sLex-Peg2000 DSPE; 1,26 mg) und Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin (DMPE; 0,22 mg) werden als Chloroform-Lösung gemischt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Lipidfilm nach eingehender Trocknung mit 1 ml EDTA-Lösung resuspendiert. Nach intensivem mehrstündigen Schütteln werden mehrschichtige Vesikel (MLV) erhalten, die nach mehrmaligem Waschen mit phosphatgepufferter, isotonischer Kochsalzlösung (PBS; pH 7.4) und anschließender Zentrifugation verwendet werden können.

## Beispiel 4b

[0051] MLV aus Beispiel 4a werden zur Herstellung von einschichtigen Vesikeln (SUV) beschallt, bis eine homogene Lösung mit einem mittleren Vesikeldurchmesser um 100 nm erreicht ist. Nach Zentrifugation (16000 g/10 min) wird der die Liposomen enthaltende Überstand abgetrennt und verwendet. Überschüssiges EDTA wird durch Gelchromatographie (Sephadex G50) abgetrennt, die nachfolgende Größen- und Gehaltsbestimmung erfolgt durch quasielastische Laserlichtstreuung (Culter M4) wie in Beispiel 4a beschrieben, und ergibt eine Liposomenpopulation mit einem Durchmesser von 85 nm (PI 0, 2).

## Beispiel 4c

[0052] MLV aus Beispiel 4a werden zur Herstellung von einschichtigen Vesikeln (LUVET) in geeigneter Weise wiederholt extrudiert (z. B. mit einem LiposoFast-Extruder durch zwei Polycarbonat-Filter mit Porendurchmesser von 100 nm), bis eine homogene Lösung mit einem mittleren Vesikeldurchmesser um 100 nm erreicht ist. Überschüssiges EDTA wird durch Gelchromatographie (Sephadex G50) abgetrennt. Der Gehalt an PC und PE wird mit der HPTLC bestimmt. Die Größenbestimmung mittels quasielastischer Lichtstreuungsmessung ergibt einen Durchmesser von 114 nm (PI 0,02). Der Lipidgehalt wird durch HPTLC quantifiziert. Der Gehalt an liposomalem PC beträgt etwa 85% der eingesetzten MLV-Suspension.



## Beispiel 4d

Durchführung des Adhäsionshemmtests mit EDTA-Glycolipsomen gemäß Beispiel 4c

- 5 [0053] In einer Mikrotiterplatte immobilisiertes E-Selektin (50  $\mu$ l mit 5  $\mu$ g/ml in Tris/Calcium-haltigem Puffer) wird mit Liposomen aus Beispiel 4c versetzt, und anschließend mit 100000 MT3 Brustkrebszellen, die 51-Chrom markiert waren, je well versetzt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Zellen werden abgewaschen und die Zahl der gebundenen Zellen nach Lyse mit NaOH über die Radioaktivmessung quantifiziert. Die Tumorzellbindung wird zu 95,6% gehemmt. Die Hemmung ist damit um 64% gesteigert gegenüber Liposomen gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne EDTA.

## Beispiel 4e

- 15 [0054]  $1 \times 10^5$  HUVEC-Zellen werden mit TNF  $\alpha$  stimuliert und nach 4 Stunden/37°C mit Liposomen aus Beispiel 4c versetzt. Anschließend werden 100000 MT3 Brustkrebszellen, die 51-Chrom markiert waren, je well zugegeben. Nach 1 Stunde bei 4°C werden die ungebundenen Zellen abgewaschen und die Zahl der gebundenen Zellen über die Radioaktivmessung nach NaOH-Lyse quantifiziert. Die Tumorzellbindung wird zu 61,6% gehemmt. Die Hemmung ist damit um 37,8% gesteigert gegenüber Liposomen gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne EDTA.

## Beispiel 5

## Mimikry Moleküle

- 20 Herstellung von sLe<sup>x</sup>-imitierenden humanen rekombinanten Antikörperfragmenten aus Antikörper-Genbibliotheken mit Hilfe der Phagen-Display-Technik

- 25 [0055] Es wurden zwei verschiedene synthetische Antikörper-Genbibliotheken verwendet, die humane single-chain Antikörperfragmente (scFv) darstellen. Die eine Antikörper-Genbibliothek besteht aus mehr als  $10^{10}$  Phagen mit jeweils verschiedenen Kombinationen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten humaner Antikörper mit zum Teil randomisierten hypervariablen Regionen, welche mit einem Peptidstück (Linker) verbunden sind und kovalent an ein Phagenhüllprotein (pIII) gebunden sind. Sie leitet sich aus einer anderen Antikörper-Genbibliothek ab (Griffiths, A. et al., 1994, EMBO J., 13: 3245–3260). Die zweite, kleinere Genbibliothek besteht aus scFv, die auf aktive Faltung der Antikörperfragmente vorselektioniert wurden. Die erste Bibliothek stammt aus dem Labor Dr. G. Winter und die zweite aus dem Labor Dr. I. Tomlinson (jeweils MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Die spezifischen Phagen wurden in 2–3 Runden selektioniert (Phagen-Panning) unter Verwendung der proteolytischen Selektionsmethode mit dem Helferphagen KM13 (Kristensen, P. und Winter, G., Folding & Design, 3: 321, 1998). Als Antigen diente der gereinigte sLe<sup>x</sup>-spezifische Mausantikörper CSLEX1 (Becton Dickinson). Es wurden 3  $\mu$ g des Antikörpers über Nacht bei 4°C und anschließend für 1 h bei RT an 200  $\mu$ l anti-Maus-IgG Dynabeads (Deutsche Dynal, Hamburg) gebunden. Die gewaschenen Beads wurden anschließend mit 30% FKS in Zellkulturmedium für 1 h bei RT blockiert und mit  $5 \times 10^{12}$  Phagen der Antikörper-Bibliotheken 2,5 h bei RT inkubiert. Nach stringenten Waschschritten (bis zu 20 mal PBS/0,1% Tween20 und darauffolgend 20 mal PBS) wurden die scFv-Phagen, die die Bindungsstelle des Antikörpers binden durch 100  $\mu$ g/ml sLe<sup>x</sup>-Polyacrylamidkonjugate (Synthesome) spezifisch eluiert und anschließend mit Trypsin behandelt. Alternativ wurden die scFv-Phagen ohne spezifische Elution durch sLe<sup>x</sup>-Kohlenhydrate durch Trypsinbehandlung (Proteolytische Selektionsmethode) direkt eluiert. Zwischen den Selektionsrunden wurden die eluierten Phagen in den Bakterien mit Helferphagen vermehrt und erneut selektioniert. Es wurden 2 bis 3 Selektionsrunden durchgeführt.

Identifizierung von Peptiden mit Hilfe einer Peptid-Genbibliothek, die sLe<sup>x</sup> imitieren

- 50 [0056] Analog dem Beispiel zur Generierung von scFv Antikörperfragmenten wurde in mehreren Selektionsrunden aus verschiedenen eigenen Peptid-Genbibliotheken, die randomisierte Peptide unterschiedlicher Länge darstellen (7–12 Aminosäuren; mit und ohne flankierende oder multiple interne Cysteine, die eine Zirkularisation der Peptide über Schwefelbrückenbindungen ermöglichen; Oligino, L., et al., J Biol Chem 272: 29046, 1997) und die  $10^6$  bis  $10^8$  verschiedene kurze Peptide an das Phagenhüllprotein pIII gekoppelt besitzen, spezifisch bindende Peptide gewonnen. Die zirkulären Peptide haben dabei bekanntermaßen im Vergleich zu den linearen Peptiden eine höhere Stabilität und teilweise Affinität. Die Selektion und Testung erfolgte wie in der Generierung der sLe<sup>x</sup> imitierenden scFv mit 3 Runden der Selektion.

## Spezifitätstests der Mimikry-Peptide und Mimikry-scFv

- 60 [0057] Die selektionierten Peptide und Antikörper-Fragmente wurden in ELISA-Tests auf ihre Bindung an verschiedene sLe<sup>x</sup>-spezifische Antikörper und E-Selektin sowie zur Kontrolle an andere IgM und IgG-Antikörper getestet. Hierfür wurden die an Phagen gekoppelte Formen der Peptide und Antikörper-Fragmente verwendet, die zuvor durch eine in 96-Well Platten durchgeführte Polyethylenglykol-Fällung gereinigt wurden. Die potentiellen Mimikry-Peptide und Mimikry-scFv wurden in ELISA-Inhibitionstests daraufhin untersucht, ob sie die Bindung der sLe<sup>x</sup>-spezifischen Antikörper an sLe<sup>x</sup>-Polyacrylamid spezifisch hemmen. Dabei wurde das sLe<sup>x</sup>-Polyacrylamid (0,5  $\mu$ g/Well) auf ELISA-Platten durch Antrocknen immobilisiert, und die Bindung der monoklonalen Antikörper durch die Mimikry-Peptide oder Mimikry-scFv in Form der synthetisierten Peptide oder gereinigten scFv alleine oder gekoppelt an Phagen konzentrationsabhängig inhibiert.



## Inhibition der Bindung von Tumorzellen an E-Selektin durch Mimikry-Peptide und Mimikry-scFv

[0058] In einer Mikrotiterplatte immobilisiertes E-Selektin (50 µl, mit 5 µg/ml in Tris/Calcium-haltigem Puffer) wird mit Bakteriophagen versetzt, die die Mimikry-Peptide gemäß Beispiel 5 in Form von Fusionsproteinen mit dem Phagenhüllprotein pVIII in hoher nicht näher bestimmter Kopienzahl auf der Oberfläche der Bakteriophagen vorliegen haben, und anschließend mit 100000 MT3 Brustkrebszellen, die 51-Crom markiert waren, je well versetzt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Zellen werden abgewaschen und die Zahl der gebundenen Zellen nach Lyse mit NaOH über die Radioaktivmessung quantifiziert. Die Tumorzellbindung ist je nach Mimikry-Peptid ähnlich den Versuchen mit den Glykoliposomen fast vollständig gehemmt.

## Patentansprüche

1. Verwendung von Schwangerschaftsproteinen oder deren Fragmenten, von Liposomen, die an Selektin binden und Calcium-bindende Verbindungen enthalten, aus nativen Quellen stammenden Muzin-Fragmenten oder Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren, oder deren Kombinationen, zur Hemmung der Adhäsion von Zellen aus dem Blutstrom an aktiviertes Endothelzellgewebe der Blutgefäße. 15
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass EDTA-enhaltende Liposomen verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Liposomen eingesetzt werden, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ als Bestandteil der Liposomenmembran tragen. 20
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Liposomen eingesetzt werden, die Antikörper, Antikörper-Fragmente, Peptide, Glycopeptide oder andere Proteine oder Glycoproteine tragen, die Selektin binden.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Liposomen eingesetzt werden, die Mimikry-Verbindungen tragen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren. 25
6. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Schwangerschaftsproteine gonadotrope Hormone,  $\alpha$ -Fetoprotein, Transferrin, Glycodeline, Immunglobulin G oder deren Fragmente eingesetzt werden.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Hemmung der Adhäsion von Tumorzellen oder Leukozyten.
8. Verwendung von Schwangerschaftsproteinen oder deren Fragmenten, von Liposomen, die an Selektin binden und Calcium-bindende Verbindungen enthalten, aus nativen Quellen stammenden Muzin-Fragmenten oder Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren, oder deren Kombinationen, zur Behandlung und Prophylaxe von entzündlichen Erkrankungen. 30
9. Verwendung von Schwangerschaftsproteinen oder deren Fragmenten, von Liposomen, die an Selektin binden und Calcium-bindende Verbindungen enthalten, aus nativen Quellen stammenden Muzin-Fragmenten oder Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren, oder deren Kombinationen, zur teilweisen oder vollständigen Verhinderung der Metastasierung oder zur Prophylaxe von Tumorerkrankungen. 35
10. Pharmazeutisches Mittel, umfassend als Wirkstoff ein oder mehrere Schwangerschaftsproteine oder deren Fragmente sowie pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe.
11. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Schwangerschaftsproteine gonadotrope Hormone,  $\alpha$ -Fetoprotein, Transferrin, Glycodeline, Immunglobulin G oder deren Fragmente sind. 40
12. Pharmazeutisches Mittel umfassend als Wirkstoff Liposomen, die an Selektin binden und Calcium-bindende Verbindungen enthalten, sowie pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe.
13. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen EDTA enthalten.
14. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen als Bestandteil der Liposomenmembran sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ tragen. 45
15. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen Antikörper, Antikörper-Fragmente Peptide, Glycopeptide oder andere Proteine oder Glycoproteine tragen, die Selektin binden.
16. Pharmazeutische Mittel nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen Mimikry-Verbindungen tragen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren. 50
17. Pharmazeutisches Mittel, umfassend als Wirkstoff ein oder mehrere Fragmente von Muzinen aus nativen Quellen sowie pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe.
18. Pharmazeutisches Mittel, umfassend als Wirkstoff eine oder mehrere Mimikry-Verbindungen, die sialylierte Kohlenhydratstrukturen vom Lewis-Typ imitieren, sowie pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe. 55

60

65

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK** (USPTO)